STA JUL 25 1939 LIBRARY

Aus dem Veterinärhygienischen und Tierseuchen-Institut der
Ludwigs-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. *K. Beller*

Über den färberischen Nachweis der Brucellen in der Milch

Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

veterinär-medizinischen Fakultät

der

Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen

vorgelegt von

Willi Treffenstädt
aus Kraftsolms, Kr. Wetzlar

Gießen 1938

Buchdruckerei Heinz Meyer, Gießen, Ludwigstraße 30

Aus dem Veterinärhygienischen und Tierseuchen-Institut der
Ludwigs-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. *K. Beller*

Über den färberischen Nachweis der Brucellen in der Milch

Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

veterinär-medizinischen Fakultät

der

Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen

vorgelegt von

Willi Treffenstädt
aus Kraftsolms, Kr. Wetzlar

Gießen 1938

Buchdruckerei Heinz Meyer, Gießen, Ludwigstraße 30

Gedruckt mit Genehmigung der veterinär-medizinischen Fakultät zu Gießen.

Referenten: Prof. Dr. K. *Beller*
Prof. Dr. *Standfuß.*

Meinen lieben Eltern!

Inhaltsübersicht.

Einleitung 5
Schrifttum 6
a) Brucellose und Brucellenausscheidung mit der Milch 6
b) Nachweis der Brucellen in der Milch 13
Eigene Untersuchungen 17
a) Vergleich der Färbungen 18
b) Aufbereitung der Milchproben 23
1. Anreicherung durch natürliches Aufrahmen . . . 23
2. Anreicherung durch Zentrifugieren 24
3. Anreicherung durch Zusatz agglutinierenden Serums 26
Zusammenfassung 29
Schlußsätze 32
Schrifttumsverzeichnis 33
Lebenslauf 36

Einleitung.

Im Kampfe des deutschen Volkes um seine Nahrungsfreiheit spielt die Viehwirtschaft, deren Leistungsfähigkeit und Leistungssteigerung eine tragende Rolle. Leistungsfähige Tiere müssen gesund sein, ihre Haltung muß den Anforderungen der Gesundheitspflege entsprechen und darauf bedacht sein, Krankheiten und Seuchen nach Möglichkeit von vornherein fernzuhalten. Wo solche aber bereits herrschen, da sind alle Maßnahmen zu ergreifen, um ihrer Herr zu werden und den durch sie verursachten gesundheitlichen, züchterischen und wirtschaftlichen Schäden entgegenzutreten.

Unter den Seuchen des Rindes stehen ihrer allgemeinen Bedeutung nach gegenwärtig die chronischen im Vordergrund. Neben der Tuberkulose und dem gelben Galt ist es namentlich die Brucellose des Rindes, die Bangbakterieninfektion, die dem deutschen Volksvermögen alljährlich schwerste Verluste beibringt und darüber hinaus eine ständige Gefährdung der menschlichen Gesundheit darstellt.

Seitdem vor einem Jahrzehnt die Empfänglichkeit des Menschen für den Erreger der Rinderbrucellose einwandfrei und endgültig festgestellt wurde und in vielen Fällen der Milchgenuß als Ansteckungsquelle nachgewiesen werden konnte, hat die an sich schon lebhafte Brucelloseforschung von der humanmedizinischen Seite her weitere Anregungen erhalten. In diesem Zusammenhang sind es vor allem die Fragen der Brucellenausscheidung mit der Milch und des Brucellennachweises in derselben, die in zahlreichen Veröffentlichungen behandelt wurden und noch weiter ihrer Bearbeitung harren.

Schrifttum.

a) Brucellose und Brucellenausscheidung mit der Milch.

Genaue Angaben über den Grad der Brucelleverseuchung des deutschen Gesamtrindviehbestandes fehlen noch. Den Angaben von *Poppe* (1922) zufolge sind schätzungsweise bis zu 30 % aller Rinderbestände verseucht. *Ernst* (1924) ermittelte bei seinen Untersuchungen 37 % serologisch positiv reagierende Tiere. In Schleswig-Holstein fand *Hegler* (1929) eine Verseuchungsziffer von 20—30 %. *Schumann* (1929), *Kathe* (1930) und *Lerche* (1931) stellten für Schlesien eine solche von 20 % fest.

Die im landwirtschaftlichen Mittelbesitze vorhandenen Rinder sind nach den Berechnungen von *Zeller* (1931) zu 20 % und diejenigen des Großbesitzes zu 30—40 % mit Brucellose behaftet; in den kleinen und kleinsten Betrieben tritt sie wesentlich seltener in Erscheinung.

Einen genaueren Einblick in die tatsächliche Brucellose-Verseuchung hat erst der vom Reichs- und Preußischen Ministerium des Innern 1935/36 in 17 preußischen Kreisen und der in Süddeutschland gelegenen Enklave Achberg (Sigmaringen) durchgeführte Großversuch ergeben. (*Zeller* 1937.) Von den dort stehenden 405 415 Rindern wurden 276 367 = 68,16 % über 1 Jahr alte serologisch untersucht. 29 599 = 10,7 % reagierten bangpositiv, darunter 29 310 = 10,99 % der weiblichen und 289 = 2,93 % der männlichen Tiere. Die untersuchten Rinder verteilen sich auf 44 869 Bestände verschiedener Größe, deren Verseuchungsgrad im einzelnen aus der *Übersicht 1* zu ersehen ist und die bereits bekannte Tatsache bestätigt, daß die Brucelloseverseuchung ähnlich der Tuberkuloseverseuchung mit der Bestandsgröße Schritt hält, in den großen Beständen (also) am größten ist, während die kleinen und kleinsten Bestände überwiegend seuchenfrei sind.

Den durch den Verlust an Kälbern, durch zurückbleibende Unfruchtbarkeit, sowie durch den Ausfall der Milchleistung ent-

stehenden wirtschaftlichen Schaden, berechnete *Zwick* (1930) für Deutschland auf jährlich 250 Millionen Reichsmark.

Übersicht 1.

Brucelloseverseuchung in 18 preußischen Kreisen nach dem Großversuch 1935/36.

Bestände			Davon erwiesen sich als					
Größe	Zahl	% der Gesamtbestände	brucellosefrei		schwach[1]) verseucht		stark[2]) verseucht	
			Bestände	%	Bestände	%	Bestände	%
50 u. mehr Tiere	594	1,32	206	34,68	129	21,71	259	43,60
20—50 Tiere	3931	8,76	2478	63,03	667	16,69	786	19,99
6—19 Tiere	17436	38,86	12926	74,13	946	5,42	3564	20,44
1— 5 Tiere	22908	51,05	19667	85,85	—	—	3241	14,14
Gesamtzahl	44869	—	35277	78,62	1742	3,88	7850	17,49

Aber nicht allein wirtschaftlich betrachtet, sondern auch hinsichtlich der menschlichen Gesundheit ist die Brucellose, wie bereits eingangs erwähnt, von erheblicher Bedeutung.

Im Jahre 1924 wurden in Nordamerika die ersten Brucelloseerkrankungen beim Menschen beobachtet, nachdem schon früher, um 1911, unsichere Angaben über menschliche Erkrankungsfälle gemacht worden waren.

In Deutschland wurde die „Bang'sche Krankheit" genannte Ansteckung erstmalig 1926 von *Kreuter* und *Steiner* sowie 1927 von *Dietel* und *Veilchenblau* sicher festgestellt. Im Jahre 1928 folgten mehrere Berichte über weitere menschliche Erkrankungen. So beschreibt *Bürger* in Kiel 25 Fälle, *Poppe* in Rostock 11, *Prausnitz* in Breslau 13 und *Habs* in Kiel 4.

Seit dem Jahre 1929/30 wurden vom Reichsgesundheitsamt auf Grund amtlicher Meldungen die in *Übersicht 2* aufgeführten Fälle mitgeteilt.

Die Ansteckung erfolgte bei der Mehrzahl der Erkrankungen mittelbar durch den Genuß infizierter Milch und Milcherzeugnisse oder unmittelbar durch die Berührung mit kranken Tieren (bei der Geburtshilfe usw.). Während die letztere Art der Ansteckung nur

[1]) bis 15% positive Reaktionen, [2]) über 15% positive Reaktionen.

Übersicht 2.

Brucelloseerkrankungen des Menschen
im Deutschen Reich 1929—1935.

Jahr	Zahl der Erkrankungen	Davon wurden hervorgerufen durch						
		Milchgenuß		Kontakt mit kranken Rindern	Milchgenuß und Kontakt	Laboratoriums-infektionen	sonstige Ursachen	unbekannte Ursachen
		Fälle	% der Gesamtfälle					
1929/30	626	211	33,7	124	53	9	13	216
1930/31	488 (520)[1]	173	36,0	76	42	3	4	190
1931/32	498	176	35,3	96	55	3	3	165
1932/33	483	166	34,3	87	49	2	3	176
1933/34	530	174	32,8	118	55	5	11	167
1934/35	513	168	32,7	100	65	2	—	178
Insgesamt	3138	1068	—	601	319	24	34	1092

[1]) Von 32 Fällen fehlen nähere Angaben, deshalb sind nur 488 Fälle berücksichtigt.

bei Personen vorkommt, deren Beruf sie in enge Berührung mit den Brucellen ausscheidenden Rindern bringt (Melker, Tierärzte u. a.), also nur einen verhältnismäßig kleinen Kreis von Menschen der Infektionsgefahr aussetzt, ist die Zahl der durch den Genuß brucellenhaltiger Milch gefährdeten Menschen ungleich größer.

Habs (1928) konnte bei den 4 von ihm beobachteten Erkrankungen den Nachweis führen, daß die Ansteckung durch den Genuß roher infizierter Milch zustande gekommen war. Im Durchschnitt sind etwa 34 % der menschlichen Erkrankungsfälle auf den Genuß brucellenhaltiger Milch zurückzuführen.

Darüber, daß von infizierten Rindern Brucellen mit der Milch ausgeschieden werden, war man zunächst im Zweifel. Als erste konnten *Mohler* (1912) zusammen mit *Schröder* und *Cotton* nachweisen, daß die schon von *Smith* (1893/94) und *Schröder* und *Cotton* weisen, daß die schon von *Smith* (1893/94) und *Schroeder* und *Cotton* (1911) beobachteten Organveränderungen bei mit Milch geimpften Meerschweinchen durch Brucellen hervorgerufen wurden, während *Zeller* (1910) sie noch als pseudotuberkulös bezeichnet hatte. *Zwick* und *Krage* (1913) erbrachten dann den eindeutigen Beweis dafür, daß mit der Milch infizierter Tiere Brucellen ausgeschieden werden können, eine Tatsache, die in der Folgezeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und, was die Praxis der Brucellosebekämpfung am einschneidendsten traf, die Ursache für das Verbot der Impfungen mit lebenden Kulturen wurde.

Nach den Untersuchungen von *Bang* und *Bendixen* (1928) scheiden ⅓ der Tiere nach dem Verkalben Brucellen mit der Milch aus. *Lerche* (1931) fand 45 % Ausscheider und *Karsten* (1932) 24 bis 70 %; bemerkenswert ist, daß er auch bei normal kalbenden Tieren zu 19—33 % Brucellen in der Milch fand.

Von den infizierten Rindern überhaupt scheiden mit der Milch Brucellen aus nach den Untersuchungen von *Klimmer* und *Haupt* (1922) 20 %, nach *Pfenninger* (1923) 35 %, nach *Hammerschmidt* (1924) 50 %, nach *Lerche* (1929) 49 %, (1931) 45,2 % und nach *Schumann* und *Lerche* (1930) 50 %. *Bogenschneider.* (1923) fand bei natürlich infizierten Kühen 12,5 % Ausscheider, unter den mit 10 bis 25 ccm lebender Kultur geimpften dagegen keine.

Wie *Karsten* (1932), *Stockmayer* (1933) und *Lübke* (1934) berichten, ist die Ausscheidung der Brucellen bei den einzelnen Tieren zeitlich und mengenmäßig sehr verschieden.

Zwick und *Krage* (1913) fanden Brucellen in der Milch von Kühen, die vor 2 Wochen, bzw. vor 6 und 13 Monaten verkalbt hatten. *Schroeder* und *Cotton* (1923) teilen Fälle mit, bei denen noch 2—4 Jahre, ja sogar 6—7 Jahre nach dem Verwerfen Brucellen in der Milch nachgewiesen werden konnten.

Die Ausscheidung beginnt nach den Angaben von *Klarin* (1932) und *Sven-Wall* (1930) ungefähr 1 Woche nach dem Verkalben und hält dann 3—4 Wochen *(Wall)* bis 2 Monate und darüber *(Klarin)* an. *Lübke* (1934) konnte bei einer infizierten Kuh 14½ Monate lang die Bakterienausscheidung beobachten und immer Brucellen in der Milch nachweisen, allerdings war die ausgeschiedene Bakterienmenge in den einzelnen Gemelkabschnitten nicht die gleiche.

Lerche (1932), *Ehrlich* (1923), *Huddleson, Hasley, Torrey* (1933) und *Bauer* (1934) fanden das Endgemelk, *Bang* und *Bendixen* (1932) dagegen das Anfangsgemelk brucellenreicher.

In der Regel sind nur einzelne Euterviertel von der Krankheit betroffen. Die hinteren Viertel sind den Angaben von *Bang* und *Bendixen* (1932) zufolge häufiger erkrankt, was *Gilman* (1932) bestätigte.

Während *Huddleson* (1933) zum Zwecke der sicheren Feststellung der Brucellenausscheidung eine Trennung des vorderen vom hinteren Gemelk fordert, gehen neuerdings die meisten Untersucher noch weiter und halten Einzelstichproben für am sichersten. *Hetz* (1921) und *Zeller* (1923) waren die ersten, die diese Ansicht vertraten. Ihnen schlossen sich dann *Ehrlich* (1923), *Gilmann* (1932), *Lerche* (1932), *Klimmer* (1932), *Stockmayer* (1933), *Plate* (1934) und *Fuest* (1935) an.

Die Menge der in der Milch enthaltenen Brucellen schwankt zeitlich außerordentlich stark. So fanden *Evans* (1915) in 1 ccm Milch 110 –4300, *Karsten* (1932) 10—2000 und *Stockmayer* (1933) 0—10000 Brucellen. In Kolostrummilch, sowie im Eutersekret trockenstehender Kühe konnte letzterer bis zu 50 000 Keime je ccm nachweisen. *Summa* (1934) stellte fest, daß die von den einzelnen Vierteln ausgeschiedenen Brucellenmenge im allgemeinen sehr gering ist.

Die Häufigkeit der Brucellenausscheider und das Zusammengießen der Sammelmilch bei ihrer molkereimäßigen Verarbeitung bringen es mit sich, daß ein großer Teil der Marktmilch nachträglich infiziert wird. Verschiedene Forscher haben Untersuchungen über die Häufigkeit des Brucellengehaltes der Handelsmilch angestellt. *Übersicht 3* gibt einen Überblick über ihre Untersuchungsergebnisse.

Aus ihnen ist zu ersehen, daß ein großer Teil der in den Verkehr gelangenden, vielfach sogar als pasteurisiert vertriebenen Milch kulturell nachweisbare, also lebensfähige Brucellen enthält und damit eine Ansteckungsquelle für die Verbraucher darstellt.

Wichtig für das Zustandekommen einer Erkrankung sowohl, wie auch für den Nachweis, besonders des kulturellen, in der Milch und den Milcherzeugnissen ist die Lebensfähigkeit der Brucellen.

Übersicht 3.

Brucellenbefunde in Handelsmilchproben
(zit. nach *Klimmer*, 1932).

Untersucher	Der Proben			davon brucellenhaltig in %
	Zahl	Art	Herkunft	
Eber	100	Marktmilch	Leipzig	19
Hetz	150	Marktmilch	Stuttgart	4,6
Hoffmann	34	Vorzugsmilch	Leipzig	62
Karsten	—	Marktmilch	Hannover	15—25
Klimmer	20	pasteurisierte Milch	Dresden	0
Klimmer u. Falke	33	Marktmilch	Leipzig	43
Klimmer u. Fritzsche	26	pasteurisierte Milch	Leipzig	14
Lerche	12	Sahne	Breslau	58,3
Derselbe	101	Marktmilch	Breslau	51,8
Derselbe	35	pasteurisierte Milch	Breslau	28,6
Meyn u. Weiske	78	Vorzugsmilch	Leipzig	35,9
Poppe	—	Marktmilch	Rostock	bis 32
Pröscholdt	—	Marktmilch	Stettin	35,5
Derselbe	—	Marktmilch	Stettin	27
Derselbe	—	Marktmilch	Stettin	23
Schwarz	94	Marktmilch	Hamburg	41,5
Winkler	30	Marktmilch	Dresden	32

Carpenter und *Boack* (1928) stellten fest, daß mit fortschreitender Säuerung der Milch die Zahl der lebensfähigen Brucellen rasch abnimmt. Genaue Versuche über die Haltbarkeit der Brucellen in Milch und Milcherzeugnissen wurden von *Drescher* und *Hopfengärtner* (1930) und von *Lerche* (1931) angestellt. Ihre Ergebnisse sind in *Übersicht 4* zusammengefaßt.

Übersicht 4.

Lebensdauer der Brucellen in Milch und Milchprodukten.

	Aufbewahrungstemperatur und entsprechende Lebensdauer			
	nach Drescher und Hopfengärtner (1930)		nach Lerche (1931)	
	Temperatur	Tage	Temperatur	Tage
Rohmilch	8—10 °C.	21	8 °C.	8—10
Magermilch	—	—	20	3— 4
desgl. sterilisiert	8—10	28	—	—
Sauermilch	4— 5	8	8	8— 9
Süßrahm (Sahne)	4— 5	37	20	5
Schlagsahne	—	—	20	4
Sauerrahm	4— 5	9	—	—
Süßrahmbutter	15	28	20	67
(Molkereibutter)	4— 5	35		
Süßrahmbuttermilch	4— 5	30	20	3
Sauerrahmbutter	4— 5	29	20	50
(Landbutter)	15	22		
Sauerrahmbuttermilch	4— 5	9	—	—
Weichkäse (Quark)	18	35	20	24
Weißkäse	—	—	20	22
Tilsiter Käse	18	35—91	—	—
Emmentaler Käse	18	49	—	—

Auch aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß die Brucellen in saurer Umgebung weniger lange lebensfähig sind als in jeder anderen. Ihre Lebensdauer genügt jedoch in allen Fällen, um durch den Genuß derartiger Milch und Milcherzeugnisse eine Ansteckung herbeizuführen.

Das Milchgesetz vom 31. Juli 1930 hat aus allen diesen Erkenntnissen heraus angesichts der Bedeutung der Brucellenausscheidung mit der Milch für Mensch und Tier im § 4 der Reichsausführungsverordnung vom 15. Mai 1931 verfügt, daß „Milch von Kühen, die infolge einer Infektion mit dem Abortusbazillus Bang erkrankt sind oder diesen Bazillus mit der Milch ausscheiden", nicht in rohem Zustand in den Handel kommen darf.

Der Gesetzgeber beschränkt sich hier nicht auf den Nachweis der Brucelloseerkrankung allein, sondern führt noch besonders die Brucellenausscheidung mit der Milch an. Wie diese Ausscheidung im einzelnen nachzuweisen ist, läßt er zunächst offen.

b) Nachweis der Brucellen in der Milch.

Der Nachweis der mit der Milch ausgeschiedenen Brucellen kann auf verschiedene Weise erbracht werden:

1. *unmittelbar* und zwar
   a) mikroskopisch
   b) kulturell;

2. *mittelbar* durch den Tierversuch am Meerschweinchen und hier wiederum
   a) serologisch
   b) pathologisch-anatomisch und kulturell.

Außerdem wird vielfach die Agglutination des Milchserums als Anzeiger für die Eutererkrankung und die mit ihr einhergehende Brucellenausscheidung zu Hilfe genommen.

Die große Zahl der über den Brucellennachweis in der Milch erschienenen Veröffentlichungen aus aller Welt entspricht den Schwierigkeiten und Unsicherheiten, die mit diesem Nachweis auch heute noch verknüpft sind.

Der *mikroskopische Nachweis* litt bislang, abgesehen von dem zahlenmäßig oft sehr spärlichen Vorhandensein der Brucellen, unter dem Mangel eines genügend spezifischen Färbeverfahrens.

Die *Kultur* hat zwar seit der Einführung von Farbstoffzusätzen, die die Begleitbakterien weitgehend im Wachstum hemmen *(Huddleson* usw.), bedeutende Fortschritte erzielt, versagt aber im Vergleich mit dem Tierversuch im größeren Teil der Fälle, zumal dann, wenn der Brucellengehalt zahlenmäßig gering oder die Milchprobe bakteriell stark verunreinigt ist, so daß es zu einer Überwucherung der Nährböden kommt.

So bleibt nach wie vor als empfindlichstes und sicherstes Nachweisverfahren immer noch der *Tierversuch am Meerschweinchen*, bei dem die durch die Milchverimpfung zustandegekommene Brucelleninfektion entweder nach 2—3 Wochen serologisch oder später pathologisch-anatomisch und kulturell festgestellt wird. Indessen ist der Tierversuch bei seiner langen Dauer ebenso zeitraubend wie kostspielig und umständlich. Die Kultur führt ihm gegenüber zeitlich zwar früher zum Ziel, ist aber aus den genannten Gründen nicht genügend verläßlich, während die *Agglutination des Milchserums* zwar leicht und rasch durchzuführen ist, über das tatsächliche Vorhandensein von Brucellen in der betreffenden Milchprobe aber keine

Auskunft gibt. Sie stützt sich lediglich auf die Erfahrungstatsache, daß mit einem positiven Agglutinationstiter von bestimmter Höhe mit ziemlicher Sicherheit und Regelmäßigkeit auch eine Ausscheidung von Brucellen vergesellschaftet ist.

Die *unmittelbare bakterioskopische Untersuchung der Milch* wurde bisher nicht planmäßig verfolgt. Sie begegnet, wie bereits erwähnt, noch großen Schwierigkeiten, würde aber bei entsprechendem Ausbau in zahlreichen Fällen, wie bei der Tuberkulose, den zeitraubenden Tier- und Kulturversuch erübrigen und somit den laufenden Untersuchungsbetrieb in den Instituten wesentlich erleichtern und abkürzen.

Die Mitteilungen im Schrifttum über die Färbung der Brucellen beziehen sich ausschließlich auf deren mikroskopische Darstellung in den Eihäuten, den foetalen Organen und im Labmageninhalt.

Brucella-abortus (Bang) ist ein sehr kleines, gramnegatives, unbewegliches Kurzstäbchen von 1—2 μ Länge und 0,3—0,8 μ Breite, das häufig, namentlich in Kulturausstrichen, kokkenförmige Gestalt zeigt. Sie läßt sich mit den gebräuchlichen Anilinfarbstoffen darstellen; auch die Giemsalösung ist für ihre Färbung gut geeignet.

Durch Differenzierung mit 1%iger Essigsäure lassen sich in Organausstrichen die Brucellen deutlicher aus ihrer Umgebung herausheben. Davon wurde bei dem bisher im hiesigen Institut gebräuchlichen einfachen Färbeverfahren Gebrauch gemacht, das in folgender Weise gehandhabt wird.

Die gut lufttrockenen Ausstriche werden in der Flamme oder mit Salzsäurealkohol (3%ig) fixiert, mit Löfflers Methylenblau 10 Minuten gefärbt und unter mäßig starkem Wasserstrahl abgespült, wobei man zu ganz kurzer Einwirkung vorsichtig etwas 1%ige Essigsäure mit unterlaufen läßt. Die Brucellen erscheinen dann als etwas kräftiger blaugefärbte, je nachdem einzeln oder in Haufen liegende, sattgefärbte Kurzstäbchen inmitten der entfärbten Umgebung.

Die von *Thorbjörnsen* (1925) und *Maternowska* (1930) angegebenen Färbeverfahren verfolgen den besonderen Zweck, in faulem Material die Brucellen aus ihrer an Begleitbakterien überreichen Umgebung deutlicher hervorzuheben.

Thorbjörnsen fixiert seine Ausstriche 10 Minuten lang in Methylalkohol, färbt 15 Minuten mit einer verdünnten Giemsalösung (30 Tropfen Giemsalösung auf 10 ccm destilliertes Wasser) und differenziert dann kurz mit 1%iger Essigsäure. Zum Abspülen benutzt er wiederum destilliertes Wasser. Er erhält auf diese Weise Bilder, in denen die grampositiven Bakterien dunkelblau, die gramnegativen und die tierischen Zellen rot erscheinen.

Maternowska legt besonderes Gewicht auf die Vorbereitung des (faulen) Materials für den Ausstrich und die Färbung. Die Vorschrift verlangt, daß die

Karunkeln vor dem Anfertigen der Ausstriche mit Wasser (u. U. destilliertem Wasser) gründlich gereinigt werden, bis die ganze Oberfläche von den anhaftenden schmierigen Massen befreit ist; letztere enthält dann immer noch viele Bakterien. Nach der Fixation erfahren die Ausstriche zur Klärung des Blickfeldes und Erhöhung der Färbbarkeit für 5 Minuten eine Behandlung mit 10%iger Kalilauge, werden dann 3—5 Minuten lang mit 2%igem Karbolthionin gefärbt und mit Wasser abgespült.

Mit beiden Verfahren lassen sich, wie die Erfahrungen des Institutes lehren, sofern das Material nicht allzu faul ist, gute Ergebnisse erzielen, wenn es bei ihnen auch nicht zu einer scharf gegensätzlichen Anfärbung der Brucellen kommt.

Den ersten Ansatz zu einer mehr oder weniger spezifischen Darstellung der Brucellen machte *Frosch* (zit. nach *Mießner* 1934).

Die Abstrichpräparate werden 5 Minuten in absolutem Alkohol fixiert. Darauf läßt man sie lufttrocken werden und färbt 5 Minuten mit Fuchsin. Nach Abspülen mit Leitungswasser werden sie in Patentblaulösung differenziert, bis die dünnen Stellen blau gefärbt erscheinen. Die Farblösung muß häufig erneuert werden; sie wird hergestellt, indem man zu 15 ccm destilliertem Wasser 3 Tropfen Essigsäure hinzufügt. Die Brucellen zeigen sich rot gefärbt auf kornblumenblauem Untergrund.

Den ersten wirklichen Fortschritt in der Brucellenfärbung brachte die 1936 von *Koslowskij* angegebene Safraninfärbung.

Der luftgetrocknete Ausstrich wird in der Flamme fixiert, der Objektträger sodann mit einer 2%igen wässrigen Safraninlösung bedeckt und bis zur Dampfbildung erhitzt. Nach dem Abspülen mit Wasser wird mit einer 0,75—1%igen Malachitgrünlösung (wässrig) ½—1 Minute nachgefärbt und wieder mit Wasser abgespült. Die Brucellen erscheinen orange-rot, das umgebende Gewebe und die Begleitbakterien grün.

Den Angaben von *Koslowskij* zufolge nehmen die Brucellen basische Anilinfarben schwerer auf als die in ihrer Gesellschaft befindlichen Begleitbakterien. Während der kurzen Zeit der Nachfärbung mit Malachitgrün werden deshalb die Brucellen nicht mitgefärbt, wohingegen sich die Begleitbakterien sehr rasch mattgrün überfärben. Umfärbung soll erst nach 25—40 Minuten beginnen. Durch Desinfektions- und Konservierungsmittel wird die Färbung nicht ungünstig beeinflußt.

Kurze Zeit nach *Koslowskij* (1936) haben *Hansen* und *Köster* (1936) ihre Ergebnisse von Untersuchungen über die Alkalifestigkeit der Brucellen bekanntgegeben. Sie fanden, daß die Färbbarkeit der Brucellen bei Alkalizusatz (KOH) zu der Farblösung bedeutend zunimmt, und die Fähigkeit der Brucellen, der korrodierenden Wirkung der Alkalien besser zu widerstehen als die meisten übrigen Bakterien, die Grundlagen für eine weitgehende spezifische Brucellenfärbung

bieten. Die von *Hansen* einerseits und *Köster* andererseits angegebenen Verfahren sind folgendermaßen aufgebaut.

Hansen verwendet zwei Farblösungen: erstens 30 ccm alkoholisch gesättigte Methylenblaulösung plus 100 ccm einer 0,04%igen Kalilauge und zweitens eine 3%ige wässrige Safraninlösung. Das Ausstrichpräparat wird an der Luft getrocknet — leichtes Erwärmen zur Beschleunigung der Trocknung schadet nichts — und in der Flamme fixiert. In der alkalisierten Methylenblaulösung wird das Präparat 1 Minute vorgefärbt und mit Leitungswasser abgespült. Dann folgen die Nachfärbung in einer 3%igen wässrigen Safraninlösung 15—20 Sekunden lang, Abspülen in Leitungswasser und Trocknen mit Fließpapier. Die Brucellen färben sich blau, der Untergrund und die Begleitbakterien rot.

Köster fixiert das lufttrockene Ausstrichpräparat in der Flamme. Die Vorfärbung geschieht mit einer stark alkalischen Safraninlösung und dauert 1 Minute. Die Lösung besteht aus 1,5 ccm einer molaren Lösung Kalilauge und 5 Tropfen einer 3%igen wässrigen Safraninlösung und wird zweckmäßig unmittelbar vor jeder Färbung frisch gemischt, damit die entstehende Safraninbase in statu nascendi wirkt. Nach dem Vorfärben wird das Präparat mit Leitungswasser abgespült und 15 Sekunden in 0,05%iger Schwefelsäure differenziert, wieder mit Wasser abgespült und dann 15 Sekunden mit einer 3%igen wässrigen Methylenblaulösung med. Höchst nachgefärbt. Die Brucellen färben sich rot, der Untergrund und die Begleitbakterien blau.

Zwar ist die Spezifität auch dieser letztgenannten Färbeverfahren nicht vollständig, doch lehrt die Erfahrung und der Vergleich mit den bisher gebräuchlichen Färbungen ihre für den gewöhnlichen Bedarf hinreichende Zuverlässigkeit in der Darstellung der Brucellen gegenüber den für gewöhnlich in brucellenhaltigem Material vorkommenden Begleitbakterien.

Eigene Untersuchungen.*

Meine eigenen Untersuchungen hatten die Aufgabe, die näheren Umstände des Brucellennachweises in der Milch zu verfolgen und ein Verfahren auszuarbeiten, das in zuverlässiger Weise diesen Nachweis ermöglicht. Ich beschäftigte mich daher vorwiegend mit der Technik der mikroskopischen Milchuntersuchung.

Im einzelnen waren von mir:

1. die bisher bekannten Färbeverfahren auf ihre Brauchbarkeit für die Färbung von brucellenhaltigen Milchausstrichen zu prüfen und gegebenenfalls in zweckentsprechender Weise abzuändern;

2. mit Hilfe der so erzielten Ergebnisse die Fragen der Milchaufbereitung für den zu färbenden Ausstrich zu untersuchen.

Aus Zweckmäßigkeitsgründen wurden die Versuche mit künstlich infizierter Milch angestellt.

Gutgewachsene 48stündige Schrägagarkulturen wurden zunächst mit 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung oder Magermilch abgeschwemmt und dann, von Fall zu Fall, mit kleineren oder größeren Mengen roher Vollmilch versetzt, so daß der für die einzelnen Versuche jeweils erwünschte Keimgehalt in der Maßeinheit zustandekam. Zur Erzielung einer gleichmäßigen Bakterienverteilung wurden die Proben vor der weiteren Verarbeitung in Gefäßen mit Glasperlen längere Zeit geschüttelt. Neben den Brucellen wurden den meisten Proben als Kontrolle für die Brucellenfärbungen andere, häufig als Begleitbakterien in der Milch zu findende Keime, wie Kokken aller Art, Kolibakterien, Pseudomilzbrand u. a. zugesetzt.

---

*) Die Arbeit wurde im Rahmen von Untersuchungen über das seuchenhafte Verkalben, zu denen das Reichs- und Preußische Ministerium des Innern dem Institut unter der früheren Leitung von Prof. Dr. W. *Zwick* Mittel zur Verfügung gestellt hatte, aufgenommen.

a) Vergleich der Färbungen.

Vor Beginn der eigentlichen Vergleichsversuche war noch die geeignetste Technik der Ausstrichanfertigung zu ermitteln. Rohe Vollmilch und Rahm ergaben dabei die besten und gleichmäßigsten Ergebnisse, wenn sie nach der Art der Blutausstriche behandelt und mit einem an einer Ecke abgeschrägten Objektträger auf dem Untersuchungsobjektträger ausgestrichen wurden. Beim Rahm ist besonders darauf zu achten, daß der Ausstrich nicht zu dick gerät, da er sonst im gefärbten Zustand schwer oder undurchsichtig wird. Für den Bodensatz eignete sich diese Art des Ausstriches nicht, da bei seiner durch allerlei Schmutzteilchen körnigen Beschaffenheit ein gleichmäßiger Ausstrich nicht gelingt, hier war die Verwendung eines geraden Drahtes vorteilhafter. Im übrigen wurde bei den Vergleichsuntersuchungen immer dieselbe Öse benutzt und ihr Inhalt auf eine jeweils gleichgroße Fläche ausgestrichen, so daß nach Menge und Dicke immer gleichmäßige Präparate erzielt wurden. Die Fixierung der Vollmilch- und Bodensatzausstriche erfolgte in üblicher Weise mit der Flamme, die der Rahmausstriche dagegen mit Rücksicht auf ihren hohen Fettgehalt durch 5 Minuten langes Eintauchen in 90%igen Methyl- oder Isopropylalkohol.

Die einfache Färbung mit Löfflers Methylenblau, die Färbungen mit Karbolthionin nach *Maternowska* und mit Giemsalösung nach *Thorbjörnsen* schieden ihrer unspezifischen Arbeitsweise wegen von vorneherein aus.

So kamen für die weitere Bearbeitung nur noch die Färbung nach *Frosch* sowie die Safraninfärbungen in Betracht, deren letztere nach den von *Koslowskij, Hansen* und *Köster* aufgestellten Vorschriften zur Anwendung gelangten.

Die Färbung nach *Frosch* mit Fuchsin und Patentblaulösung, die bei anderem Material z. T. sehr gute Bilder hervorbringt, erbrachte auch bei Milch im allgemeinen zufriedenstellende Ergebnisse, zeigte jedoch den Nachteil, daß nicht selten auch ein Teil der Begleitbakterien rot angefärbt wird. Dies mag seinen Grund mit in der Eigenart der differenzierenden Gegenfärbung mit der Patentblaulösung haben, die zu zahlreichen Zufälligkeiten Gelegenheit bietet, weil der richtige Zeitpunkt für die Beendigung der Gegenfärbung an dem feuchten Präparat nur sehr schwer zu erkennen ist. Der Untergrund erscheint daher häufig entweder zu stark oder zu schwach gefärbt, während die Brucellen im ersteren Falle bereits blau und die Begleitbakterien im letzteren Falle noch nicht genügend

angefärbt sind. Trotz der an sich guten Untergrundfärbung wurde aus den genannten Gründen von der weiteren Anwendung der *Frosch*'schen Färbung für den vorliegenden Zweck Abstand genommen.

Wesentlich bessere Bilder ließen sich mit dem Verfahren nach *Koslowskij* erzielen. Die Brucellen färben sich mit Safranin satt rot, sofern die Färbezeit nicht zu kurz gewählt wird. Wichtig und ausschlaggebend für den Ausfall der Präparate ist die Zeit der Gegenfärbung mit Malachitgrün. Bei zu kurzer Gegenfärbung zeigen sich auch einzelne Begleitbakterien (Stäbchen) noch rot. Die Brucellen nahmen auch bei längerer Färbedauer das Malachitgrün nicht an. Nach *Koslowskij* soll die Umfärbung erst nach 25—40 Minuten beginnen, was sich bei den hiesigen Versuchen bestätigt hat. Rahm- und Bodensatzausstriche nehmen die Gegenfärbung mit Malachitgrün häufig nur sehr unregelmäßig an, auch läßt sich die grüne Farbe beim Abspülen mit Wasser außerordentlich leicht abwaschen, so daß hierbei besondere Vorsicht am Platze ist.

Die von *Hansen* für die Vorfärbung mit alkoholischer Methylenblaulösung angegebene Zeit von einer Minute erwies sich für die Milchausstriche als zu kurz, da ein großer Teil der Brucellen sich nicht färbte. Durch eine längere Einwirkung des Farbstoffes wurde dieser Nachteil zwar behoben, indessen färbten sich dann auch zahlreiche Begleitbakterien blau. Die Treffsicherheit des *Hansen*'schen Verfahrens stand demnach derjenigen des *Koslowskij*'schen Verfahrens nach.

Auch bei dem Verfahren nach *Köster* zeigte es sich, daß ein großer Teil der Brucellen bei Einhaltung der Originalvorschrift und unter Verwendung der 3%igen Methylenblaulösung blau gefärbt in Erscheinung trat. Dem konnte durch den Gebrauch einer nur 1%igen Methylenblaulösung abgeholfen werden, die für die sichere Blaufärbung der Begleitbakterien immer noch ausreichend war. Als besonderer Nachteil der *Köster*'schen Anordnung wurde der Umstand empfunden, daß die alkalisierte Safraninlösung immer ganz kurz vor dem Färben frisch angesetzt werden mußte, da nach einer Minute schon sich ein Farbniederschlag bildete, der die Lösung zur Färbung unbrauchbar machte.

Beim Vergleich untereinander ging als verhältnismäßig bestes, einfachstes und für den weiteren Ausbau aussichtsreichstes Verfahren dasjenige von *Koslowskij* hervor, das in den nachfolgenden Versuchen ausschließlich und insbesondere hinsichtlich der Farbstoffe

für die Gegenfärbung, der Farbstoffverdünnungen und der Färbezeit weiter verfolgt wurde.

Unter Verwendung der von *Koslowskij* angegebenen 2%igen Safraninlösung wurden zunächst *(siehe Übersicht 5)* verschiedene Farbstoffe auf ihre Eignung zur Gegenfärbung geprüft, wobei besonderes Augenmerk darauf gelenkt war, daß zwischen den mit Safranin rot gefärbten Brucellen und ihrer Umgebung ein möglichst starker, für das Auge aber auch bei langdauerndem Arbeiten angenehmer Farbgegensatz zustande kam. Das von *Koslowskij* verwandte Malachitgrün wirkte gerade in letzterer Hinsicht auf die Dauer sehr unangenehm und störend.

Zur Gegenfärbung wurden herangezogen:

1. Malachitgrün (0,75-, 1- und 2%ig)
2. Karbolmethylviolett
3. Löfflers Methylenblau
4. Viktoriablau 4 R (0,5- und 1%ig)
5. Karbolthionin
6. Methylenblau med. Höchst (1- und 2%ig).

Die aufgebrachte Safraninlösung wurde zunächst bis eben zum Aufwallen erhitzt und wirkte dann 3 Minuten lang ein. Dieses Vorgehen erschien zweckmäßiger als die wiederholte Erhitzung. Dicke Ausstriche, namentlich Rahmausstriche erforderten eine Differenzierung mit 1%iger Essigsäure, die sich auch bei anderen Ausstrichen als vorteilhaft erwies, wenn sie vorsichtig durchgeführt wurde. Bei Rahmausstrichen ist weiterhin Vorsicht in der Behandlung geboten, weil sonst leicht Teile des Ausstriches sich vom Objektträger lösen und abschwimmen.

Alle Farbstoffverdünnungen kamen nacheinander mit 1, 2 und 3 Minuten Färbedauer zur Anwendung.

Zusammengefaßt hatten diese Versuche folgende Ergebnisse:

Mit Malachitgrün wurden keine gleichmäßigen Erfolge erzielt. Kurze Einwirkungszeiten von 1—2 Minuten zeitigten bessere Bilder als längere (3 Minuten).

Karbolmethylviolett, wie es zur modifizierten Gramfärbung benutzt wird, färbte den Bakterienuntergrund zu stark, desgleichen *Löfflers Methylenblau* und *Viktoriablau 4 R* in den angegebenen Verdünnungen. *Karbolthionin* gab keinen zweckentsprechenden Farbgegensatz und wirkte klecksig.

Übersicht 5.

Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener *Gegenfärbungen.*

Versuch Nr.	Farblösung (wässrig)	Verdünnung %	Ausfall der Färbung bei einer Färbezeit von			
			1 Minute	2 Minuten	3 Minuten	Bemerkung
1	Malachitgrün	0,75	++	++	+	Färbung
	Malachitgrün	1,0	++	++	+	ungleich-
	Malachitgrün	2,0	++	+	+	mäßig
2	Karbolmethyl-violett	wie für Gram-färbung	—	—	—	Färbung zu dicht
3	Viktoriablau	0,5	—	—	—	Färbung
	4 R	1,0	—	—	—	zu dicht
4	Löfflers Methylenblau	—	—	—	—	Färbung zu dicht
5	Methylenblau	1	+++	+++	++	
	med. Höchst	2	+++	++	+	
6	Karbolthionin	—	—	—	—	Kein Farbgegensatz

Zeichenerklärung: — = schlecht.
+ = mäßig.
++ = befriedigend.
+++ = gut bis sehr gut.

Die besten Bilder brachte *Methylenblau med. Höchst* in der Verdünnung von 1 % bei einer Färbezeit von einer Minute hervor. Es kam daher bei allen folgenden Versuchen in dieser Weise zur Verwendung.

Im nächsten Versuch wurden verschiedene Safraninverdünnungen vergleichsweise untersucht, um im Verein mit der Methylenblaugrundfärbung den besten Färbeerfolg für die Brucellen zu ermitteln. Bei einer Färbezeit von 1, 2, 3 und 4 Minuten wurden Safraninverdünnungen von 1, 2, 3 und 4 % angewandt; dabei kamen, um alle Zufälligkeiten auszuschließen, für jede Färbezeit und Farbverdünnung Milchausstriche mit 4 verschiedenen Brucellenstämmen zur Verwendung. Wie aus *Übersicht 6* hervorgeht, war zur Erzielung guter Bilder eine mindestens 2%ige Safraninlösung erforderlich, die wenigstens 4 Minuten zur Einwirkung kommen mußte. Bei Benutzung einer 3%igen Safraninlösung konnte die Färbezeit um eine Minute herabgesetzt werden. Die 4%ige Lösung hatte der 3%igen gegenüber keine Vorteile zu verzeichnen.

Übersicht 6.
Zusammenfassung der Färbungen mit verschiedenen *Safraninverdünnungen.*

Versuch Nr.	Safraninlösung %ig	Zeit	Ausfall der Färbung in der Milchprobe mit			
			Br.St. 166	Br.St. 77	Br.St. 118	Br.St. 27
1	1	1 Minute	—	—	—	—
2	1	2 Minuten	—	—	—	—
3	1	3 „	+	+	++	+
4	1	4 „	++	++	++	+
5	2	1 Minute	—	—	—	—
6	2	2 Minuten	+	+	++	+
7	2	3 „	++	++	++	++
8	2	4 „	+++	+++	+++	+++
9	3	1 Minute	—	—	—	—
10	3	2 Minuten	++	++	++	+
11	3	3 „	+++	+++	+++	+++
12	3	4 „	+++	+++	+++	+++
13	4	1 Minute	+	+	++	+
14	4	2 Minuten	++	++	++	+
15	4	3 „	+++	+++	+++	+++
16	4	4 „	+++	+++	+++	+++

Zeichenerklärung:
— = schlecht.
\+ = mäßig.
++ = befriedigend.
+++ = gut bis sehr gut.
Br.St. = Brucella-Stamm.

Im Gegensatz zu *Koslowskij*, der sich mit einer 2%igen Lösung begnügte, erwies sich für die Färbung von Milchausstrichen die Anwendung einer 3%igen Safraninlösung als vorteilhafter. Das für alle weiteren Versuche in Anwendung gekommene Färbeverfahren stellt sich nun folgendermaßen dar:

Vollmilch und Rahm werden nach Art von Blutausstrichen, Bodensatz mit einem geraden Draht, dünn und gleichmäßig ausgestrichen. Vollmilch und Bodensatzausstriche werden lufttrocken in der Flamme, Rahmausstriche in 90%igem Methyl- oder Isoprophyl-

alkohol 5 Minuten lang fixiert. Dann wird der Objektträger mit einer 3%igen wässerigen Safraninlösung bedeckt und bis eben zum Aufwallen der Lösung erhitzt, nach 3 Minuten langer Einwirkung die Farbe kräftig mit Wasser abgespült und der Ausstrich 10 Sekunden in 1%iger Essigsäure differenziert und wieder mit Wasser abgespült. Anschließend wird mit einer 1%igen wässerigen Methylenblaulösung (med. Höchst) 1 Minute gegengefärbt, mit Wasser abgespült und das Präparat mit Fließpapier getrocknet. Die Brucellen erscheinen leuchtend rot auf blauem Untergrund, die Begleitbakterien sind satt blau gefärbt. Zwischen den rot gefärbten Brucellen finden sich ganz vereinzelt auch blau gefärbte. Ob es sich dabei um ältere oder abgestorbene Brucellen handelt, konnte nicht erwiesen werden, in anderem Zusammenhang im Institut gemachte Erfahrungen sprechen vielleicht dafür.

b) Aufbereitung der Milchproben.

Die im allgemeinen spärliche Verteilung der Brucellen in der Milch macht es, mehr noch wie für die Kultur für den mikroskopischen Bakteriennachweis, notwendig, daß die zu untersuchenden Milchproben aufbereitet werden, um die bestmögliche Anreicherung der Brucellen für die Färbung zu erreichen. Die nachfolgenden Untersuchungen stellten es sich zur Aufgabe, die verschiedenen Anreicherungsmöglichkeiten vergleichsweise durchzuprüfen. Als solche kamen in Betracht:

1. das natürliche Aufrahmen,
2. das Zentrifugieren,
3. der Zusatz agglutinierenden Serums.

Um eine Vergleichsmöglichkeit zu haben, wurde so vorgegangen, daß in jedem Ausstriche in 10 gleichmäßig begrenzten Blickfeldern die vorhandenen Brucellen ausgezählt wurden. Zu diesem Zwecke wurde in das Okular ein kleines Messingscheibchen eingelegt, aus dessen Mitte ein Rechteck von 2 : 4 mm Seitenlänge ausgestanzt war. Dadurch entstand eine auch bei Anwesenheit zahlreicher Brucellen übersichtliche Blickfeldbegrenzung. Aus den in 10 dieser Felder ermittelten Keimzahlen wurde dann der Durchschnitt errechnet.

1. Anreicherung durch natürliches Aufrahmen.

Die Proben wurden zum Aufrahmen in Zentrifugenröhrchen 10 ccm gefüllt, im Dunkeln bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen. Jeweils nach 2, 4, 6 und 24 Stunden wurden dann zunächst

vom Rahm und dann nach vorsichtigem Abgießen des Rahmes und der Magermilch aus dem Bodensatz Ausstriche angefertigt und nach der zuletzt genannten Vorschrift gefärbt. *Übersicht 7* stellt die Ergebnisse von 4 verschiedenen Untersuchungen einzeln und zusammengefaßt übersichtlich einander gegenüber. Aus ihr geht hervor, daß beim Stehenlassen der Milchproben im Laufe der Zeit immer mehr Brucellen mit dem Rahm nach oben steigen, während die Keimzahl im Bodensatz allmählich bis zu einem gewissen Grade abnimmt. Schon nach zweistündigem Stehen war die Zahl der im Rahm befindlichen Brucellen wesentlich größer als die zu Beginn des Versuches untersuchte Vollmilchkontrolle. Die Zahl der im Bodensatz befindlichen Brucellen überschritt die der in der Vollmilch gefundenen in der Regel nicht und bewegte sich nach 24 Stunden wesentlich unter den in den Kontrollproben ermittelten Zahlen.

2. Anreicherung durch Zentrifugieren.

Ganz andere Verhältnisse ergaben sich beim Zentrifugieren der Proben, die 10, 15, 20 und 30 Minuten ausgeschleudert wurden. Nach dem Zentrifugieren befanden sich im Rahm grundsätzlich weniger Brucellen als im Bodensatz. Schon nach 10 Minuten langem Ausschleudern zeigten sich (siehe ebenfalls *Übersicht 7)* deutliche Unterschiede, die bei weiterem Zentrifugieren immer größer wurden. Nach 30 Minuten war die Brucellenzahl im Bodensatz um ein mehrfaches größer als in den entsprechenden Rahmproben. Ihrer räumlichen Verteilung nach verhielten sich die an der Rahmschicht befindlichen Brucellen gleichmäßig; so bestand namentlich an der Röhrchenwand keine zahlenmäßige Anreicherung.

Untereinander verglichen zeigten die Versuche, daß die Brucellen sich beim natürlichen Aufrahmen und beim Zentrifugieren entgegengesetzt verhielten. Im ersteren Falle steigt die Mehrzahl verhältnismäßig schnell nach oben, im letzteren dagegen sammeln sie sich am Boden. Das sechsstündige Stehenlassen der Proben erbrachte etwa das gleiche Gesamtergebnis wie das 20 Minuten lange Zentrifugieren derselben.

Übersicht 8 zeigt die Ergebnisse zweier Versuche, durch Vermischung der Untersuchungsmilch mit spezifisch schwereren Lösungen und Flüssigkeiten eine Änderung des spezifischen Gewichtes der Milch herbeizuführen, um zu sehen, wie sich die Brucellen unter diesen Umständen beim Zentrifugieren verhalten.

Übersicht 7.

Brucellenbefunde nach *natürlichem Aufrahmen* und nach dem *Zentrifugieren.*

	Zeit	Zahl der mikroskopisch ermittelten Brucellen Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	zusammen
Vollmilchkontrolle		14	11	22	34	81
		beim natürlichen Aufrahmen				
Rahm nach	2 Stunden	29	18	23	43	111
„ „	4 „	24	24	24	37	109
„ „	6 „	24	30	28	42	124
„ „	24 „	30	38	32	48	148
Bodensatz	2 „	17 (46)	18 (36)	22 (45)	32 (73)	89 (200)
„	4 „	11 (35)	16 (40)	13 (37)	22 (59)	62 (171)
„	6 „	8 (32)	21 (51)	16 (44)	11 (53)	56 (180)
„	24 „	9 (39)	16 (54)	12 (44)	18 (66)	55 (203)
		nach dem Zentrifugieren				
Rahm nach	10 Sekund.	11	18	22	21	72
„ „	15 „	10	13	16	31	70
„ „	20 „	8	9	13	19	49
„ „	30 „	7	6	14	8	35
Bodensatz	10 „	16 (27)	22 (40)	24 (46)	18 (39)	80 (152)
„	15 „	24 (34)	34 (47)	33 (49)	42 (73)	133 (203)
„	20 „	29 (37)	31 (40)	42 (55)	38 (57)	140 (189)
„	30 „	41 (48)	42 (48)	48 (62)	57 (65)	188 (223)

Anmerkung: Die in (...) Klammern gesetzten Zahlen geben die Zahl der in Rahm und Bodensatz zusammen gefundenen Brucellen an.

Unter normalen Verhältnissen hatte die Milch bei einer Temperatur von 21° C ein spezifisches Gewicht von 1,03. Zu gleichen Teilen mit Glycerin gemischt, stieg es auf 1,11, mit gesättigter Pottaschelösung auf 1,12 und mit gesättigter Kochsalzlösung auf 1,21. Der Zusatz von Glycerin und Pottaschelösung brachte keine wesentlichen Veränderungen im Verhalten der Brucellen, Kochsalzlösung dagegen steigerte den Brucellengehalt im Rahm auf etwa das doppelte gegenüber der unvermischten Milch. Praktische Bedeutung dürfte dieser Weg der Anreicherung zunächst noch nicht haben.

Übersicht 8.

Verhalten der Brucellen bei *Änderung des spezifischen Gewichtes der Milch* durch spezifisch schwerere Zusätze.

Zusätze ää	spezifische Gewichte	Zahl der ermittelten Brucellen					
		Versuch 1			Versuch 2		
		Rahm	Bodensatz	zus.	Rahm	Bodensatz	zus.
Milch ohne Zusatz	1,03	26	74	100	23	76	99
Milch mit Glyzerin	1,11	26	80	106	20	80	100
Milch mit Pottaschelösung (gesättigt)	1,12	28	59	87	27	62	89
Milch mit Kochsalzlösung (gesättigt)	1,21	34	70	113	56	65	121
Vollmilchkontrolle	1,03	—	—	45	—	—	42

Anmerkung: Sämtliche Proben wurden 30 Minuten lang zentrifugiert.

c) Zusatz agglutinierenden Serums.

Als dritte Möglichkeit einer Brucellenanreicherung für die Milchausstriche wurde die Verwendung agglutinierenden Serums herangezogen, in der Absicht, die spärlich vorhandenen und einzeln liegenden Keime in kleinen Gruppen zusammenzuballen, um sie so leichter sichtbar zu machen. Gleichzeitig sollte dieses Verfahren beim Brucellennachweis durch die Färbung auch die Untersuchung auf die Spezifität derselben unterstützen. Vom agglutinierenden Serum wurde im hiesigen Institut auch bei länger zurückliegenden kulturellen Untersuchungen mit Vorteil Gebrauch gemacht; *Klimmer* und *Klitzschmüller* (1936) haben ungefähr zur selben Zeit einen ähnlichen Weg beschritten.

Für die Art der Serumverwendung bestand eine Reihe von Möglichkeiten. So konnten die Proben einmal gleich zu Beginn im Zentrifugenröhrchen mit Serum versetzt und entweder sofort nach dem Durchschütteln zentrifugiert oder zuvor einige Zeit im Brutschrank gehalten werden, zum anderen konnte der Serumzusatz unmittelbar vor dem Ausstreichen auf dem Objektträger erfolgen.

Anordnung und Ergebnis dieser Versuche gehen aus der *Übersicht 9* hervor.

Übersicht 9.

Mikroskopische Brucellenbefunde bei
Zusatz von agglutinierendem Serum.

Probe Nr.	Behandlung der Milch		Zahl der ermittelten Brucellen				
			Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Zus.
	A. Rahm						
1	Milch ohne Serum		3	8	4	6	21
2	5 ccm Milch + 1 ccm Serum	—	31	29	10	13	83
3		1h 37° C	19	27	9	13	68
4	Nr. 1	+ 1 Öse agglutinierendes Serum auf Objektträger	11+H	21+H	12+H	7+H	51+H
5	Nr. 2		55+H	23+H	14+H	7+H	99+H
6	Nr. 3		47+H	25+H	15+H	9+H	96+H
	B. Bodensatz						
1	Milch ohne Serum		77 (80)	52 (60)	48 (52)	36 (42)	213 (234)
2	5 ccm Milch + 1 ccm Serum	—	126 (157)	61 (90)	43 (53)	39 (52)	269 (352)
3		1h 37° C	88 (107)	89 (116)	57 (66)	43 (56)	277 (345)
4	Nr. 1	+ 1 Öse agglutinierendes Serum auf Objektträger	56+H (67+H)	54+H (75+H)	33+H (45+H)	34+H (41+H)	177+H (228+H)
5	Nr. 2		44+H (99+H)	43+H (66+H)	35+H (49+H)	31+H (38+H)	153+H (252+H)
6	Nr. 3		36+H (83+H)	40+H (65+H)	34+H (49+H)	30+H (39+H)	140+H (236+H)
	Vollmilchkontrolle		16	12	5	7	40

Anmerkungen: Die Proben 1—3 wurden 30 Minuten lang zentrifugiert. Die in (....) Klammern gesetzten Zahlen geben die in Rahm und Bodensatz zusammen gefundenen Brucellen an.

Zeichenerklärung: + H = neben den einzeln liegenden Brucellen in einem Häufchen gelegenen, zahlenmäßig nicht zu ermitteln.

Die Technik war folgende: je 5 ccm Vollmilch wurden mit 1 ccm agglutinierenden Serums in der Verdünnung 1 : 10 versetzt und der eine Teil der erhaltenen Proben nach kurzem Durchschütteln unmittelbar 30 Minuten zentrifugiert, während der andere Teil zunächst bei 37° C eine Stunde im Brutschrank gehalten wurde. Danach wurden in der bereits vorher beschriebenen Weise aus Rahm und Bodensatz Ausstriche angefertigt und gefärbt. Außerdem wurden aus den so vorbereiteten Proben je eine Öse auf dem Objekt-

träger nach Art der Schnellagglutination mit einer Öse agglutinierenden Serums verrieben und die Ausstriche auf dem für dieses Verfahren bei Untersuchungen auf Kückenruhr üblichen Leuchtkasten langsam zum Eintrocknen gebracht, worauf die Färbung nach der angegebenen Art erfolgte.

Die Serumverdünnung von 1 : 10 wurde deshalb gewählt, weil bei Verwendung unverdünnten Serums oder geringerer Verdünnungsgrade die Ausstriche beim Trocknen und Fixieren in störender Weise rissig wurden. Zur Kontrolle wurden Milchproben ohne Serumzusatz nebenher verarbeitet.

Durch den Serumzusatz im Reagenzglas wurden sowohl im Rahm wie auch im Bodensatz die Zahlen der gefundenen Brucellen in den verschiedenen Versuchen mehr oder weniger stark vermehrt. Die Brucellen lagen dabei einzeln, da die durch das Serum hervorgerufenen Anhäufungen beim Ausstrichvorgang vermutlich wieder getrennt wurden. Im Rahm war die Zunahme der Brucellen gegenüber den Kontrollen verhältnismäßig stärker als im Bodensatz.

In den auf dem Objektträger nochmals agglutinierten Proben fanden sich jeweils auch einzelne Bakterienhäufchen, zwischen denen einzelne Brucellen lagen. Insgesamt traten auf diese, zahlenmäßig nicht vollständig erfaßbare Weise wesentlich mehr Brucellen zutage, als bei der alleinigen Agglutination im Reagenzglas.

Bei dieser Gelegenheit konnte auch festgestellt werden, daß die Safraninfärbung sich auf die durch das spezifische Serum agglutinierten Keime beschränkte, während die beigegebenen Begleitkeime die Gegenfärbung annehmen. Die Safraninfärbung der Brucellen darf also praktisch als weitgehend spezifisch angesehen werden.

Zusammenfassung.

Der färberische Nachweis der in der Milch befindlichen Brucellen erfordert neben einem zuverlässigen Färbeverfahren eine sorgfältige Aufbereitung der zu untersuchenden Milchproben zum Zwecke der Anreicherung und leichteren Auffindung der in der Regel nur in spärlichen Mengen vorhandenen Brucellen. Die vergleichsweise Prüfung der für den gegebenen Fall in Betracht kommenden Färbeverfahren nach *Frosch*, *Koslowskij*, *Hansen* und *Köster* ergab, daß dasjenige von *Koslowskij* die meiste Aussicht bot und durch einige kleine Abänderungen für den besonderen Fall der Milchuntersuchung eingerichtet werden konnte.

Statt der von *Koslowskij* angewandten 2%igen wässerigen Safraninlösung wurde eine 3%ige gewählt und die Einwirkungszeit auf 3 Minuten festgesetzt, wobei der Farbstoff zu Beginn bis eben zum Aufwallen erhitzt wurde.

Das von *Koslowskij* zur Gegenfärbung benutzte Malachitgrün wich dem für das Auge angenehmere und gegenstandsreichere Bilder liefernden Methylenblau (med. Höchst), das in 1%iger wässeriger Lösung für 1 Minute zur Verwendung kam.

Kommen brucellenhaltige Milchproben durch Stehenlassen natürlich zum Aufrahmen, so steigt der größere Teil der Brucellen allmählich mit dem Rahm nach oben. Durch 20—30 Minuten langes Zentrifugieren werden aber im Bodensatz wesentlich mehr Brucellen festgestellt, so daß dieses Verfahren den Vorrang verdient; die hierbei entstehende Rahmschicht ist verhältnismäßig brucellenarm.

Der Zusatz agglutinierenden Serums in der Verdünnung 1 : 10 (5 ccm Milch + 1 ccm Serum) vor dem Zentrifugieren vermag die Ergebnisse noch weiter zu steigern, allerdings ohne daß dabei eine bemerkenswerte Zusammenballung der Brucellen zu beobachten ist; diese kann erreicht werden, wenn die bereits mit Serumzusatz zentrifugierten Proben bei der Ausstrichanfertigung mit je 1 Öse Serum (1 : 10) verrieben und langsam eingetrocknet werden. Dann finden sich neben einzeln liegenden Brucellen jeweils auch kleinere oder

größere Brucellenhäufchen, die mit ihrem eindeutigen Verhalten gegenüber der Safraninfärbung gleichzeitig einen Anhaltspunkt für den praktisch spezifischen Wert dieser Färbung bieten.

Besondere Sorgfalt ist der Anfertigung der Ausstriche zu widmen, da hiervon die Güte der Färbeergebnisse abhängt. Vollmilch und Rahmausstriche werden zweckmäßigerweise nach Art der Blutausstriche angefertigt, Ausstriche aus dem Bodensatz durch gleichmäßiges Verteilen mit einem geraden Draht. Die Fixierung erfolgt mit Ausnahme der in 90%igem Methyl- oder Isopropylalkohol zu behandelnden Rahmausstriche in der Flamme. Dicke Ausstriche sind nach der Safraninfärbung in 1%iger Essigsäure gut zu differenzieren; in allen übrigen Fällen genügt eine kurze Einwirkungsdauer von 5—10 Sekunden.

Mit Hilfe der besprochenen Anreicherungsverfahren und der entsprechend eingestellten Färbung war es möglich, auch in den brucellenarmen Milchproben einen zuverlässigen Befund zu erheben.

Schlußsätze.

1. An künstlich mit Brucellen infizierten Milchproben wurden die besonderen Verhältnisse des färberischen Brucellennachweises untersucht.
2. In vergleichenden Versuchen mit den von *Frosch, Koslowskij, Hansen* und *Köster* beschriebenen Färbe-Verfahren erwies sich dasjenige von *Koslowskij* als am zweckentsprechendsten. Es wurde für die Milchuntersuchung wie folgt eingestellt:
   a) Fixierung der Ausstriche mit der Flamme (Rahmausstriche in 90%igem Methyl- oder Isopropylalkohol),
   b) Bedecken der Ausstriche mit 3%iger wässeriger Safraninlösung, Erhitzen bis eben zum Aufwallen und 3 Minuten langes Einwirken des Farbstoffes.
   c) Abspülen mit Wasser.
   d) Je nach Dicke des Ausstriches. Differenzieren mit 1%iger Essigsäure (10 Sekunden).
   e) Abspülen mit Wasser.
   f) Gegenfärbung mit 1%iger wässeriger Methylenblaulösung (med. Höchst) für 1 Minute (bei dicken Ausstrichen entsprechend kürzer).
   g) Abspülen mit Wasser. Abtrocknen.
3. Natürliches Aufrahmen reichert die Brucellen im Rahm an. Durch 20—30 Minuten langes Zentrifugieren werden jedoch im Bodensatz ungleich bessere Ergebnisse erzielt.

Der Zusatz von agglutinierendem Serum (1 : 10 verdünnt) vor dem Zentrifugieren und vor Anfertigung der Ausstriche, bringt die beste Anreicherung zustande.

Am Schlusse der Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, den Herren Prof. Dr. *W. Zwick* und Prof. Dr. *K. Beller* für die freundliche Überlassung des Themas zu danken.

Herrn Oberassistenten Dr. *E. Schwarzmaier* möchte ich Dank sagen für die Unterstützungen und Anregungen, die er mir bei Anfertigung der Arbeit zuteil werden ließ.

1. *Bang, O. und Bendixen, H. C.* (1928):
Om forekomsten af abortbakterier (Bakt. Ab. Bang) i maelk af koer, der har kastet. — Medl. f. d. dan. Dyrlaeg. *11*, S. 145.
2. *Dieselben* (1932): Untersuchungen über latente Euterinfektionen beim Rind, hervorgerufen durch Abortus-Bakterien. — Zschr. f. Inf.-Kr. d. Haustiere *42*, S. 81.
3. *Bauer, H.* (1934): Beitrag zur Frage der Ausscheidung von Bangbazillen mit der Milch einer natürlich infizierten Kuh. — Dissertation München.
4. *Bogenschneider, J.* (1923):
Beiträge zur Frage der Ausscheidung der Abortusbazillen nach subkutaner Impfung mit lebender Kultur. — Dissertation Berlin.
5. *Bürger, M.* (1928): Infektion durch den Bacillus abortus Bang beim Menschen. — Münch. med. Wschr. *75*, S. 745.
6. *Carpenter, C. M. und Boak, R.* (1928):
Brucella abortus in milk and dairy products. — Amer. J. public. Health. *18*, S. 743.
7. *Dietel, Fr.* (1927): Bacillus-abortus-Bang-Infektion beim Menschen. — Münch. med. Wschr. *74*, S. 1704.
8. *Drescher (o. V.) und Hopfengärtner (o. V.* (1930):
Die Haltbarkeit der Bangschen Abortusbazillen in Milch und Milchprodukten. — Münch. tierärztl. Wschr. *1930*, S. 466, 483, 496, 507, 519, 533.
9. *Eber, A.* (1923): Das seuchenhafte Verkalben und seine Bekämpfung. —
10. *Ehrlich, K.* (1923): Dtsch. tierärztl. Wschr. *31*, S. 281.
Die Bekämpfung des seuchenhaften Verkalbens mit besonderer Berücksichtigung der Impfungen. — Dtsch. tierärztl. Wschr. *31*, S. 314.
11. *Ernst, W.* (1924): Zur Bekämpfung des seuchenhaften Verwerfens der Rinder. — Dtsch. tierärztl. Wschr. *32*, S. 400.
12. *Evans, A. C.* (1915): Bacillus abortus in market milk. Science (N. Y.) n. ser. *42*, S. 352.
13. *Falke, W.* (1931): Zur hygienischen Untersuchung und Beurteilung der Marktmilch einer Großstadt Mitteldeutschlands. — Dissertation Leipzig.
14. *Frosch* (o V.): zit. nach *Mießner* (1934).
15. *Gilman, H. L.* (1930): Further studies on the relation of the milk agglutination titre to the elimination of Bact. Abortus from the udder of the cow. — Cornell Vet. Vol. XXI, p. 243.
16. *Habs, H.* (1928): Febris undulans (Bakt. Abortus Bang) in Deutschland. — Ergebn. d. inn. Med. *34*, S. 567.
17. *Hammerschmidt, J.* (1924):
Gegenwärtiger Stand der Forschung über die Bakteriologie der Milch. — Zbl. f. d. ges. Hyg. *5*, S. 273.

*) (o. V.) = ohne Vornameangabe.

18. *Hansen, K. und Köster, H.* (1936):
Nachweis von Brucella abortus (Bang) auf Grund der Alkalifestigkeit. — Dtsch. tierärztl. Wschr. *1936*, S. 793.
19. *Hegeler, C.* (1929): Über Banginfektion. — Münch. med. Wschr. *76*, S. 2112.
20. *Hetz, J.* (1921): Untersuchungen über den Nachweis des Bangschen Abortusbacillus in der Milch unter besonderer Berücksichtigung seines Vorkommens in der Stuttgarter Marktmilch. — Dissertation Gießen.
21. *Hoffmann, W.* (1930): Die Beschaffenheit der Vorzugsmilch einer mitteldeutschen Großstadt vom Standpunkt der Milchhygiene. — Dissertation Leipzig.
22. *Huddleson, J. F. und Forest (o. V.)* (1933):
Procedures for the detektion of the Brucella in milk. — Amer. I. publ. Health. *25*, S. 130.
23. *Huddleson, J. F., Hasley, D. E. und Torrey, J. P.* (1933):
Journ. inf. Dis. *40*, 352.
24. *Karsten (o. V.)* (1932): Über das Vorkommen und den Nachweis von Abortusbakterien in der Milch der Kühe. — Dtsch. tierärztl. Wsch. *40*, S. 689.
25. *Kathe (o. V.)* (1930): Infektionen des Menschen mit dem Bakt. abortus Bang in Schlesien. — Med. Welt *1930*, S. 81.
26. *Klarin (o. V.)* (1932): Jahresber. d. Vet. med. *1932*, S. 1127
27. *Klimmer, M.* (1932): Abortus Bang und Milchhygiene. — Berl. tierärztl. Wschr. *48*, S. 87 und 151.
28. *Klimmer, M. und Falke (o. V.)* (1931):
Wie steht es mit der Milchhygiene? — Berl. tierärztl. Wschr. *47*, S. 446.
29. *Klimmer, M. und Fritzsche (o. V.)* (1931):
Milchwirtschaftliche Forschungen *1931*.
30. *Klimmer, M. und Haupt, H. (1922):*
Ist das Corynebakterium abortus infectiosi Bang für Menschen pathogen? — Münch. med. Wschr. *1922*, S. 146.
31. *Klimmer, M. und Klitschmüller, P.* (1936):
Zum züchterischen Nachweis von Abortus-Bang-Bakterien in der Milch. (Vorl. Mitteilung.) — Berl. tierärztl. Wschr. *52*, S. 326.
32. *Koslowskij, E. V.* (1936):
Methode der bakterioskopischen Diagnose der Brucellosen. — Isowjetskaja Vet. *1936*, H. 1, S. 15
33. *Kreuter, E.* (1926): Über Infektion mit Bacillus Bang beim Menschen. — Münch. med. Wschr. *1936*, S. 2193.
34. *Lerche (o. V.* (1929): Versuche zur Abortus-Bang-Infektion des Rindes. — Dtsch. tierärztl. Wschr. *37*, S. 681.
35. *Derselbe* (1931): Abortus-Bang-Bakterien in Milch und Milchprodukten vom Rind. — Zschr. f. Inf-Kr. d. Haustiere *38*, S. 253.
36. *Derselbe* (1932): Welches Gemelk eignet sich am besten zum Nachweis der Abortus-Bang-Bakterien? — Tierärztl. Rdsch. *1932*, S. 279.
37. *Lübke, A.* (1934): Untersuchungen an einer latent infizierten, mit der Milch Bangbakterien ausscheidenden Kuh. — Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilkde. *1934*.
38. *Maternowska, J. (Lwow)* (1930):
Eine neue Färbungsmethode zum Nachweis der Abortus Bang-Bakterien in natürlich faulendem Material. — Zbl. f. Bakt. I. O. *116*, S. 422.
39. *Meyn, A. und Weiske, G.* (1931):
Untersuchungen über den Abortusbakteriengehalt der Vorzugsmilch einer Großstadt. — Zschr. f. Fleisch- und Milchhyg. *41*, S. 277.

40. Mießner, H. (1934): Die Brucellose. — Med. Klin. *1934*, S. 1022.

41. Das Milchgesetz vom 31. Juli 1930.

42. Mohler, J. R. (1913): Infectious abortion of cattle. — 28. Rep. Bureau of Animal Industry for 1911, Washington *1913*, S. 147.

43. Naumann, W. (1931): Untersuchungen über die Verbreitung und Bedeutung der Bang-Bakterien-Infektion des Menschen. — Dissertation Gießen.

44. Pfenninger, W. (1923): Zur Diagnose der Bazillenausscheider in der Milch beim durch Bac. Bang verursachten Verwerfen des Rindes. — Schweiz. Arch. f. Tierheilkde. *65*, S. 600.
Die Diagnose und Bekämpfung des ansteckenden Verkalbens. — Dtsch. tierärztl. Wschr. *30*, S. 675.

46. Derselbe (1928): Die Banginfektion des Menschen. — Daselbst *36*, S 781.

47. Prausnitz, C. (1929): Infektionen des Menschen mit Bacillus abortus (Bang). — Dtsch. med. Wschr. *55*, S. 127.

48. Pröscholdt, S. (1929): Die Feststellung der Ausscheidung von Abortus-Bang-Bakterien mit der Milch. — Berl. tierärztl. Wschr. *1932*, S. 190.

49. Reichsausführungsverordnung vom 15. Mai 1931.

50. Smith, Th. (1893/94): zit. nach Zeller (1923).

51. Schroeder, E. G. und Cotton, W. E (1913):
The Bacillus of infectious abortion found in milk. — 28. Annual Rep. Bur. of Animal Ind. for 1911, Washington 1913, S. 139.

52. Dieselben (1923): zit. nach Zeller (1923).

53. Schumann (o. V.) (1929:
Die Abortus-Bang-Infektion in den Rinderbeständen. Bericht der Zusammenkunft südostd. Bakt., Hygieniker und Medizinalbeamten in Breslau 1929.

54. Schwarz, M. (1929): Zum Nachweis von Abortus-Bang-Bakterien in der Milch. — Zschr. für Fleisch- und Milchhyg. *39*, S. 175.

55. Statistische Berichte und Mitteilungen über Erkrankungen des Menschen an Brucellose in Deutschland. — Zschr. f. Fleisch- und Milchhyg. *41*, S. 483, *43*, S. 92 und 362, *45*, S. 69, *46*, S. 157 und 447.

56. Steinert, K. (1926): Zur Frage: Ist der Bang-Bacillus für Menschen pathogen? — Münch. tierärzt. Wschr. *77*, S. 73.

57. Stockmayer, W. (1933): Über die Feststellung der Bang-Bazillen in Milchproben mit Hilfe von Elektivnährböden. — Berl. tierärzt. Wschr. *49*, S. 594.

58. Derselbe (1932): Kulturelle Untersuchungen über die Ausscheidung von Bangbazillen mit der Milch. — Zschr. f. Inf.-Kr. d. Haustiere *44/45*, S. 105.

59. Summa, H. (1934): Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Bacterium Abortus-Bang in Milch. — Dissertation Gießen.

60. Thorbjörnsen (o. V.): Kgl. Vet. og Landbok. Aarskrift, Kopenhagen *1925*, S. 12.

61. Veilchenblau (o. V.) (1927):
Die Infektion mit dem Bacterium abortus boum (Bang). — Münch. med. Wschr. *1927*, S. 1705.

62. Wall, S. (1930): Über das Vorkommen von B. abortus in der Milch von Kühen, die infolge einer Infektion mit Bangschen Abortusbakterien verkalbt haben. — XI. Intern. Tierärztl. Kongreß, London.

63. Winkler, M. (1919): Über die Ausscheidung des Bacillus abortus Bang mit der Milch. — Dissertation Dresden.

64. Zeller, H. (1923): Weitere Untersuchungen über das seuchenhafte Verwerfen des Rindes. — Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilkde. *49*, S. 65.

65. Derselbe (1931): Ätiologie und Prophylaxie der Brucellosen. Abortus und Melitensis. Übertragung auf den Menschen. — Berl. tierärztl. Wschr. *47*, S. 565.

66. Derselbe (1937): Die Ergebnisse des Großversuches zur Feststellung der Verbreitung der Rinder-Tuberkulose und Brucellose. — Dtsch. Tierärztebl. *1937*, S. 301.

67. Zwick, W. und Krage (o. V.): Über die Ausscheidung von Abortusbazillen mit der Milch infizierter Tiere. — Berl. tierärztl. Wschr. *1913*, S. 41.

68. Zwick, W. (1930): Ansteckendes Verwerfen bei Rind, Schaf und Schwein. — Dtsch. tierärztl. Wschr. *38*, S. 549 und 567.

Lebenslauf.

Am 15. Juli 1911 wurde ich, *Willi Treffenstädt*, als Sohn des Landwirtes und Maurers Jakob Treffenstädt und seiner Ehefrau Maria Treffenstädt, geborene Döpp, zu Kraftsolms, Kreis Wetzlar, geboren. Nach dem Besuche der dortigen Volksschule trat ich in die Stein-Aufbauschule zu Wetzlar ein, wo ich am 5. März 1931 die Reifeprüfung bestand. Im Sommersemester 1931 begann ich an der Universität zu Gießen das Studium der Veterinärmedizin. Die tierärztliche Vorprüfung bestand ich im Sommersemester 1934, die tierärztliche Prüfung im Wintersemester 1936/37. Vom 1. Februar 1937 bis zum 30. April 1937 war ich als Praktikant am Schlachthof in Gießen beschäftigt, um dann am 1. Mai 1937 meine Bestallung als Tierarzt zu erhalten. Mit Ausnahme einer achtwöchigen Übung beim Militär war ich dann als Vertreter in der Praxis tätig.